

第 891,2113 号

US N 09/485, 699

初審 (特許) 世界知的所有権機関
特許庁 国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



| | | |
|--|----|--|
| (51) 国際特許分類6 C12Q 1/60 | A1 | (11) 国際公開番号 WO99/10526 (43) 国際公開日 1999年3月4日 (04.03.99) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP98/03771 (22) 国際出願日 1998年8月25日 (25.08.98) (30) 優先権データ 特願平9/244821 1997年8月27日 (27.08.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 第一化学薬品株式会社 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.) [JP/JP] 〒103-0027 東京都中央区日本橋3丁目13番5号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 中西一夫 (NAKANISHI, Kazuo) [JP/JP] 中村光浩 (NAKAMURA, Mitsuhiro) [JP/JP] 日野浩一 (HINO, Koichi) [JP/JP] 真鍋満久 (MANABE, Mitsuhiro) [JP/JP] 〒301-0852 茨城県竜ヶ崎市向陽台3丁目3番1号 第一化学薬品株式会社内 Ibaraki, (JP) | | (74) 代理人 弁理士 小野信夫 (ONO, Nobuo) 〒101-0025 東京都千代田区神田佐久間町3-22 神田SKビル6階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, KR, MX, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 |
| (54) Title: METHODS FOR QUANTITATING HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN CHOLESTEROL (54) 発明の名称 高比重リポタンパクコレステロールの定量法 (57) Abstract Methods for quantitating HDL cholesterol, comprising adding to serum a surfactant selected from among polyoxyethylene alkylene phenyl ethers and polyoxyethylene alkylene tribenzylphenyl ethers and an enzyme reagent for assaying cholesterol, optionally together with a substance capable of inhibiting the reaction of cholesterol in serum lipoproteins with the above enzyme reagent, and determining the amount of the cholesterol thus reacted within a period of time where cholesterol in HDL, among lipoproteins, preferentially reacts with the above enzyme reagent. By using this method, cholesterol in HDL can be conveniently and efficiently quantitated without resort to any pretreatment such as centrifugation. Thus, it is applicable to various automatic analyzers. | | |

(57)要約

血清に対し、ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤、ならびにコレステロール測定用酵素試薬を添加し、リポタンパク質のうち、HDL中のコレステロールが優先的にコレステロール測定用酵素試薬と反応する時間内にそのコレステロールの反応量を測定するHDLコレステロールの定量法および更に血清リポタンパク質中のコレステロールとコレステロール測定用酵素試薬との反応を阻害する効果を有する物質を加えたHDLコレステロールの定量法である。

本定量法は、遠心分離などの前処理の必要がなく、簡便な操作で効率よくHDL中のコレステロールを測定することができ、種々の自動分析装置に適用できるものである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|-----------|----|----------------|----|------------|
| AL | アルバニア | FI | フィンランド | LK | スリ・ランカ | SI | スロヴェニア |
| AM | アルメニア | FR | フランス | LR | リベリア | SK | スロヴァキア |
| AT | オーストリア | GA | ガボン | LS | レソト | SL | シエラ・レオネ |
| AU | オーストラリア | GB | 英国 | LT | リトアニア | SN | セネガル |
| AZ | アゼルバイジャン | GD | グレナダ | LU | ルクセンブルグ | SZ | スワジランド |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GE | グルジア | LV | ラトヴィア | TD | チャード |
| BB | バルバドス | GH | ガーナ | MC | モナコ | TC | タークス |
| BE | ベルギー | GM | ギニア | MD | モルドヴァ | TJ | タジキスタン |
| BF | ブルキナ・ファソ | CN | ギニア・ビサウ | MG | マダガスカル | TM | トルクメニスタン |
| BG | ブルガリア | CW | キニア・ビサウ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア | TR | トルコ |
| BJ | ベナン | GR | ギリシャ | | 共和国 | TT | トリニダード・トバゴ |
| BR | ブラジル | HR | クロアチア | ML | マリ | UA | ウクライナ |
| BY | ベラルーシ | HU | ハンガリー | MN | モンゴル | UG | ウガンダ |
| CA | カナダ | ID | インドネシア | MR | モーリタニア | US | 米国 |
| CC | 中央アフリカ | IE | アイルランド | MW | マラウイ | UZ | ウズベキスタン |
| CG | コンゴ | IL | イスラエル | MX | メキシコ | VN | ヴェトナム |
| CH | スイス | IN | インド | NE | ニジェール | YU | ユーゴスラビア |
| CI | コートジボアール | IS | アイスランド | NL | オランダ | ZW | ジンバブエ |
| CM | カメルーン | IT | イタリア | NO | ノルウェー | | |
| CN | 中国 | JP | 日本 | NZ | ニュージーランド | | |
| CU | キューバ | KE | ケニア | PL | ポーランド | | |
| CY | キプロス | KQ | ケルギスタン | PT | ポルトガル | | |
| CZ | チェコ | KP | 北朝鮮 | RO | ルーマニア | | |
| DE | ドイツ | KR | 韓国 | RU | ロシア | | |
| DK | デンマーク | KZ | カザフスタン | SD | スーダン | | |
| EE | エストニア | LC | セントルシア | SE | スウェーデン | | |
| ES | スペイン | LI | リヒテンシュタイン | SG | シンガポール | | |

明 細 書

高比重リポタンパクコレステロールの定量法

5 技 術 分 野

本発明は、遠心分離などの操作の必要がなく、少ない試料で簡便な操作により効率良く高比重リポタンパク（HDL）中のコレステロールのみをHDL以外のリポタンパク中のコレステロールと分離して定量することのできる方法に関する。

10

背 景 技 術

コレステロール等の脂質は、血清中においてアポタンパクと結合し、リポタンパク質を形成している。リポタンパク質は物理的な性状の違いにより、カイロミクロン、超低比重リポタンパク（VLDL）、低比重
15 リポタンパク（LDL）、高比重リポタンパク（HDL）等に分類される。これらのリポタンパク質のうち、LDLは動脈硬化を引き起こす原因物質の一つであり、一方HDLは抗動脈硬化作用を示す事が知られている。

疫学的には、HDL中のコレステロール値は動脈硬化性疾患の発症頻
20 度と逆相関を示す事が知られており、今日では、虚血性心疾患の予防や診断を目的としてHDL中のコレステロールの測定が広く行われている。HDL中のコレステロールの測定法としては、たとえば超遠心分離によってHDLを他のリポタンパクと分離した後、コレステロール測定に供する方法や、電気泳動によって分離した後に脂質の染色を行って、その
25 発色強度を測定する方法が知られている。しかしながら、これらの方法は、いずれも、操作が煩雑であったり、多数の検体を処理できないなど

の問題があり、日常的にほとんど用いられていなかった。

現在臨床検査の領域で一般に広く用いられている、HDL中のコレステロールの測定方法は、検体に沈殿剤を加えてHDL以外のリポタンパクを凝集させ、これを遠心分離によって取り除き、分離されたHDLのみを含む上清中のコレステロールを測定する沈殿法である。この方法は、超遠心法や電気泳動法に比較して簡便であるものの、沈殿剤を加えて分離する操作を含むために、比較的多量の検体量を要し、又、分析誤差を生じる可能性も高く、全分析工程を完全に自動化することはできなかった。

一方、酵素的にHDL中のコレステロールを分別定量する方法も検討されている。たとえば、胆汁酸塩及び非イオン系界面活性剤の存在下に、酵素反応を行う方法（特開昭63-126498号公報）が知られている。この方法は、反応初期の酵素反応はLDL濃度に比例し、その後HDL中のコレステロール濃度に比例することを利用したものであるが、HDL中のコレステロールと他のリポタンパク質の中のコレステロールの反応を完全に分別することはできず、正確性に問題があった。

また、HDL以外のリポタンパク質をあらかじめ凝集させておき、HDL中のコレステロールのみを酵素的に反応させた後に、酵素を失活させると同時に凝集を再溶解して吸光度を測定するという方法（特開平6-242110号）が知られている。しかしながら、この方法は少なくとも3回の試薬を添加する操作が必要であるため、限定された自動分析装置にしか適用できず、汎用性の点で問題があった。また、沈殿の再溶解に際しては、高濃度の塩を使う等、分析器機に対するダメージや試薬廃棄の点でも満足できるものではなかった。

更に、特許第2600065号では、通常の沈殿法に用いられる、HDL以外のリポタンパクを沈殿させる沈殿試薬と一般的なコレステロー

ル測定試薬を組み合わせて使用し、沈殿しないHDL中のコレステロールを測定する方法が開示されている。しかし、この特許の実施例に従ってHDL中のコレステロールを測定することは不可能であり、発明を構成する要素を錯誤により欠落させた特許と考えられるものであって、
5 先行技術になり得ないものである。

発 明 の 開 示

本発明者らは血清中のリポタンパク中のコレステロールの測定について種々検討していたところ、リポタンパクを溶解する特定の界面活性剤の存在下で血清とコレステロール測定用酵素試薬との反応を行えば、ま
10 ず最初にHDLコレステロールのみが反応し、次いでHDLの反応に遅れてVLDL中のコレステロールが反応し、最後はかなり遅れてLDL中のコレステロールが反応することを知った。

そして、更に研究を行った結果、最初のHDLコレステロール濃度に
15 依存する反応を測定できるよう測定ポイントを適宜選択することにより、HDLコレステロールのみを測定できること、および系内に血清リポタンパク内のコレステロールとコレステロール測定用酵素との反応を阻害する物質を存在せしめることにより、HDLコレステロールの濃度のみ
20 に依存した反応を長時間にわたって維持できること、更にこれらの方法は自動分析装置にも適用できることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、血清に対し、ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤、ならびにコレステロール測定用酵素試薬を添加し、リポタンパク質のうち、HDL中のコレステロールが
25 優先的にコレステロール測定用酵素試薬と反応する時間内にそのコレステロールの反応量を測定することを特徴とするHDLコレステロールの

定量法を提供するものである。

また、本発明は、上記HDLコレステロールの定量法において、更に血清リポタンパク質中のコレステロールとコレステロール測定用酵素試薬との反応を阻害する効果を有する物質を加えた方法を提供するものである。

更に本発明は、上記各方法を有利に実施しうる測定用試薬および試薬キットを提供するものである。

図面の簡単な説明

- 図1は、実施例1における本発明方法と沈殿法の分析値の相関関係を示す図面であり、図2は、実施例2における本発明方法と沈殿法の分析値の相関関係を示す図面である。

発明を実施するための最良の形態

- 本発明方法で用いられるポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤（以下、「溶解促進性活性剤」という）は、リポタンパク質を溶解する作用を有する界面活性剤である。このうち前者の市販品の例としてはエマルゲンA-60（花王社製）などが、後者の市販品の例としてはエマルゲンB66（花王社製）等があげられる。

- かかる界面活性剤は、単独で又は2種以上を組み合わせ用いる事ができる。またその使用量は化合物によって異なり、特に制限されるものではないが、試薬を適用すべき分析装置毎に、望ましい測定時間内にHDLコレステロールが検出できる感度となるよう、実験的に定めることができ、通常は0.01-5重量%の濃度にて使用するのが好ましい。

また、本発明の測定方法においては、血清リポタンパク質のコレステ

ロールとコレステロール測定用酵素試薬との反応を阻害する効果を有する物質（以下、「反応阻害物質」）の存在下で行うことが好ましく、そうすることにより存在しない場合に比較して、より長時間HDLコレステロールの濃度のみに依存した反応を維持することができる。

- 5 本発明で用いられる反応阻害物質としては、リポタンパク質に結合親和性を示す物質やリポタンパク質を溶解しない界面活性剤が挙げられ、それぞれ単独であるいは複数の物質を組み合わせる用いることができる。

10 リポタンパク質に結合親和性を示す物質（以下、「結合性物質」という）の例としては、ポリアニオンと2価金属塩を生成する物質の組み合わせを挙げることができるが、これはHDLとも結合し沈殿を生じるような物質であってもかまわない。具体的なポリアニオンの例としては、デキストラン硫酸、リンタングステン酸、ヘパリン等が、2価金属塩を生成する物質の例としては、 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、 $NiCl_2$ 等の2価金属の塩化物やこれらの水和物等が挙げられる。これらの結合性物質は、単独で又は2種以上を組み合わせる用いることができ、またその使用量は物質の種類によって異なり、特に限定されるものではないが、反応終濃度として、ポリアニオンの場合には0.002-10重量%、2価金属塩を生成する物質の場合には0.01-5重量%となる範囲で用いるのが望ましい。

- 20 また、リポタンパク質を溶解しない界面活性剤（以下、「溶解阻害性活性剤」という）としては、例えばポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン縮合物、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩等から選ばれる界面活性剤が挙げられる。

25 これらのうち、ポリオキシエチレンアルキルエーテルとしては、ポリ

オキシエチレンセチルエーテル（市販品としてはエマルゲン２２０（花王社製）等）が；ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルとしては、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル（市販品としてはエマルゲン９１３（花王社製）等）が；ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン縮合物としてはプルロニックＦ－８８（旭電化社製）が；ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩としてはポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム（市販品としてはエマール２００（花王社製）等）が；アルキルベンゼンスルホン酸塩としてはドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムが好ましい。

これらの溶解阻害性活性剤は、１種又は２種以上を組み合わせて用いる事ができ、その使用量は特に限定されないが、試料と混合したときの濃度が０．０１－５重量％、特に０．０５－１重量％になるような範囲で用いるのが望ましい。

溶解促進性活性剤とコレステロール測定用酵素試薬（以下、「コレステロール試薬」という）を検体である血清へ添加するに際しては、それぞれを別途添加しても、また混合物として同時に添加してもよい。また、反応阻害物質は、溶解促進性活性剤とコレステロール試薬のいずれかまたはこれらの混合物に添加して用いることができる。更に、複数の反応阻害物質を使用する場合は、混合して単独の場合と同様に用いられるほか、溶解促進性活性剤とコレステロール試薬にそれぞれ別に添加して用いてもよい。

本発明のコレステロールの測定のために用いるコレステロール試薬としては、公知の酵素試薬、例えばコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼの組み合わせ、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールデヒドロゲナーゼの組み合わせ等が挙げられる。これらのうち、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダー

ぜの組み合わせが好ましい。

更に、これらのコレステロール試薬を添加した後、最終的にコレステロールの反応量を測定するために用いる方法は特に制限されず、例えばパーオキシダーゼと色原体をさらに組み合わせて行う吸光度分析、補酵素や過酸化水素を直接検出する方法等が挙げられる。

本発明方法においては、HDLのコレステロールが優先的にコレステロール測定用酵素試薬と反応する時間内にその反応を検出する必要があるが、そのためには溶解促進性活性剤とコレステロール試薬と試料とを混合した後の、進行する反応を動力学的にモニターする方法や、HDLコレステロールの反応を反応終末点法で測定してブランク値にて補正する方法（２ポイント法）等を用いることができる。また、HDLの反応をより長くモニターする必要がある場合には、反応阻害物質を添加し、コレステロールの検出反応を遅延させる事によって、HDLコレステロール濃度のみに依存する反応を延長させることができる。

本発明方法を有利に実施するために利用される試薬ないし試薬キットとしては、例えば次のものを挙げることができる。

（１）次の２成分（イ）および（ロ）を含有するもの。

（イ）溶解促進性活性剤

（ロ）コレステロール試薬

（２）次の成分（イ）～（ハ）、

（イ）溶解促進性活性剤

（ロ）反応阻害物質（結合性物質、溶解阻害性活性剤）

（ハ）コレステロール試薬

このような試薬や試薬キットには、前記の溶解促進性活性剤、コレステロール試薬（コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ

等)、反応阻害物質(結合性物質、溶解阻害性活性剤)、パーオキシダーゼ、色原体、補酵素等の他、適当なpH緩衝剤、酸化防止剤、担体等を組み合わせることができる。また、試薬や試薬キットの形状としても、液体状のもの他、これを凍結乾燥したもの等が利用できる。

5

実施例

次に、実施例を挙げて本発明をさらに説明するが、本発明はこれに何ら制約されるものではない。

10 実施例 1

リポタンパク質を含む50例の血清検体について、以下の本発明方法及び従来の沈殿法により、HDL中のコレステロールを定量し、これらの測定値を比較した。

本発明方法は、各血清検体3 μ lに、100mMのMES緩衝液(第一試薬; pH6.5)300 μ lを添加し、約5分後に、エマルゲンB-66 1%、コレステロールエステラーゼ 1U/ml、コレステロールオキシダーゼ 1U/ml、パーオキシダーゼ 5U/ml及びジスルフホブチルメタトルイジン 0.04%、4-アミノアンチピリン 0.004%を含む100mMのMES緩衝液(pH6.5)からなるコレステロール測定試薬(第二試薬)100 μ lを加え、第二試薬直前と添加後5分後の600nm(副波長 700nm)における吸光度を測定し、その差より血清検体中のHDLコレステロール濃度を求めた(2ポイント法)。また、較正用物質として濃度既知のコントロール血清を用いた。なお、以上の操作は、日立7150型自動分析装置を用いて行った。

25

一方、沈殿法によりHDL中のコレステロールを測定するには、デキ

ストラン硫酸 0.3%及び塩化マグネシウム 2%を含む水溶液 200 μ lを検体 200 μ lと混和し、3000rpmで10分間遠心分離を行った。この上清50 μ lを採取し、Triton X-100 1%、コレステロールエステラーゼ 1U/ml、コレステロールオキシダーゼ 1U/ml、パーオキシダーゼ 5U/ml及びジスルフホブチルメ
5 タトルイジン 0.04%、4-アミノアンチピリン 0.004%を含む100mMのMES緩衝液(pH6.5)からなるコレステロール測定試薬3mlと混合し、37℃で10分間インキュベートした後、600nmにおける吸光度を測定し、HDL中のコレステロール濃度を求めた。

10 本発明法と沈殿法による結果の相関図を図1に示すが、本発明方法は簡便な操作であるにもかかわらず、従来の沈殿法と極めて良好な相関を示していた。

実施例 2

15 第二試薬中のエマルゲンB-66の代わりにエマルゲンA-60 1%を添加した以外は実施例1と同一の試薬を用い、同一の方法でリポタンパク質を含む50例の血清検体について、HDL中のコレステロールを定量した。

即ち、検体3 μ lに第一試薬300 μ lを添加し、約5分後、第二試薬100 μ lを加えた。第2試薬添加後、12秒後から24秒後までの546nm(副波長660nm)における吸光度変化を測定し、血清検体中のHDLコレステロール濃度を求めた。また、校正用物質としては濃度既知の2種類のコントロール血清(低濃度と高濃度)を使用した。なお、以上の操作は、日立7150型自動分析装置を用いて行
20 った。
25

また、同じ検体について、従来の沈殿法で実施例1と同様に、HDL

中のコレステロールを定量し、これらの測定値を比較した。この結果を図2に示す。

図2の結果から、本発明方法は簡便な操作であるにもかかわらず、従来の沈殿法と良好な相関を示した。

5

実施例 3

実施例2において用いたのと同じの第二試薬と、下記の第一試薬を用い、リポタンパク質を含む50例の血清検体について、本発明方法及び従来の沈殿法により、HDL中のコレステロールを定量し、これらの測定値を比較した。なお、第一試薬A（実施例2と同じ）は対照として加えた。

10

[第一試薬]

第一試薬A：

100mMのMES緩衝液（pH6.5）

15

第一試薬B：

プルロニックF-88（旭電化社製）0.2%水溶液

第一試薬C：

リンタンゲステン酸ナトリウム 0.2%及び塩化マグネシウム

100mMを含む水溶液（pH6.4）

20

第一試薬D：

プルロニックF-88 0.2%、リンタンゲステン酸ナトリウム 0.2%及び塩化マグネシウム 100mMを含む水溶液（pH6.4）

25

吸光度の測定は、反応阻害物質の添加の効果を確認するため、日立7150を用いて第二試薬添加後12秒から24秒後、12秒後から16

8 秒後及び 1 2 秒後から 3 1 2 秒後のそれぞれ異なる測光時間を用いて測定を行った。

一方、沈殿法による HDL の測定は実施例 1 と同様に行い、各条件での本発明方法との相関関係を調べた。この相関係数を表 1 に示す。

表 1

| | 測 定 時 間 | | |
|--------|----------------|------------------|------------------|
| | 1 2 - 2 4 秒 | 1 2 - 1 6 8 秒 | 1 2 - 3 1 2 秒 |
| 第一試薬 A | 0.922 | 0.488 | 0.336 |
| 第一試薬 B | 0.739 | 0.900 | 0.846 |
| 第一試薬 C | 0.543 | 0.946 | 0.747 |
| 第一試薬 D | 0.045 | 0.972 | 0.988 |

この結果に示されるように、反応阻害物質を含まない第一試薬では、反応初期の吸光度測定でのみ良好な結果を示した。一方、反応阻害物質を含むプルロニック F-88（旭電化社製）0.2%水溶液、リンタングステン酸ナトリウム 0.2%及び塩化マグネシウム 100mMを含む水溶液（pH 6.4）並びにプルロニック F-88 0.2%、リンタングステン酸ナトリウム 0.2%及び塩化マグネシウム 100mMを含む水溶液（pH 6.4）をそれぞれ第一試薬として用いた測定結果では、長時間の測定でいずれも良好な相関（1に近いほど相関性が高い）を示し、反応阻害物質が、HDL コレステロール量に依存する反応

を延長する効果があることが確認された。

産業上の利用可能性

5 本発明によれば、遠心分離などの前処理の必要がなく、簡便な操作で
効率良くHDL中のコレステロールを定量する事ができる。また、少
ない試料で、簡便な操作により、特異的な測定が可能であるため、種々
の自動分析装置に適用でき、臨床検査の領域において極めて有用である。

10

15

20

25

請 求 の 範 囲

1. 血清に対し、ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれる界面活性剤、ならびにコレステロール測定用酵素試薬を添加し、
- 5 リポタンパク質のうち、高比重リポタンパク質中のコレステロールが優先的にコレステロール測定用酵素試薬と反応する時間内にそのコレステロールの反応量を測定することを特徴とする高比重リポタンパク質コレステロールの定量法。
2. 血清に対し、ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選
- 10 ばれる界面活性剤、血清リポタンパク質中のコレステロールとコレステロール測定用酵素試薬との反応を阻害する効果を有する物質、ならびにコレステロール測定用酵素試薬を添加し、リポタンパク質のうち、高比重リポタンパク質中のコレステロールが優先的にコレステロール測定用
- 15 酵素試薬と反応する時間内にそのコレステロールの反応量を測定することを特徴とする高比重リポタンパク質コレステロールの定量法。
3. 血清リポタンパク質中のコレステロールとコレステロール測定用酵素試薬との反応を阻害する効果を有す物質がリポタンパク質を溶解しない界面活性剤又はポリアニオンと2価金属イオンを生成する物質の組
- 20 み合わせである請求項2記載の高比重リポタンパク質コレステロールの定量法。
4. 次の成分（イ）および（ロ）、
- （イ）ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれ
- 25 る界面活性剤
- （ロ）コレステロール測定用酵素試薬

を含有する高比重リポ蛋白質コレステロール測定用試薬もしくは試薬キット。

5. 次の成分（イ）～（ハ）、

5 （イ）ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル及びポリオキシ
 シエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルから選ばれ
 る界面活性剤

 （ロ）血清リポタンパク質中のコレステロールとコレステロール測定
 用酵素との反応を阻害する効果を有する物質

 （ハ）コレステロール測定用酵素試薬
10 を含有する高比重リポ蛋白質コレステロール測定用試薬もしくは試薬キ
 ット。

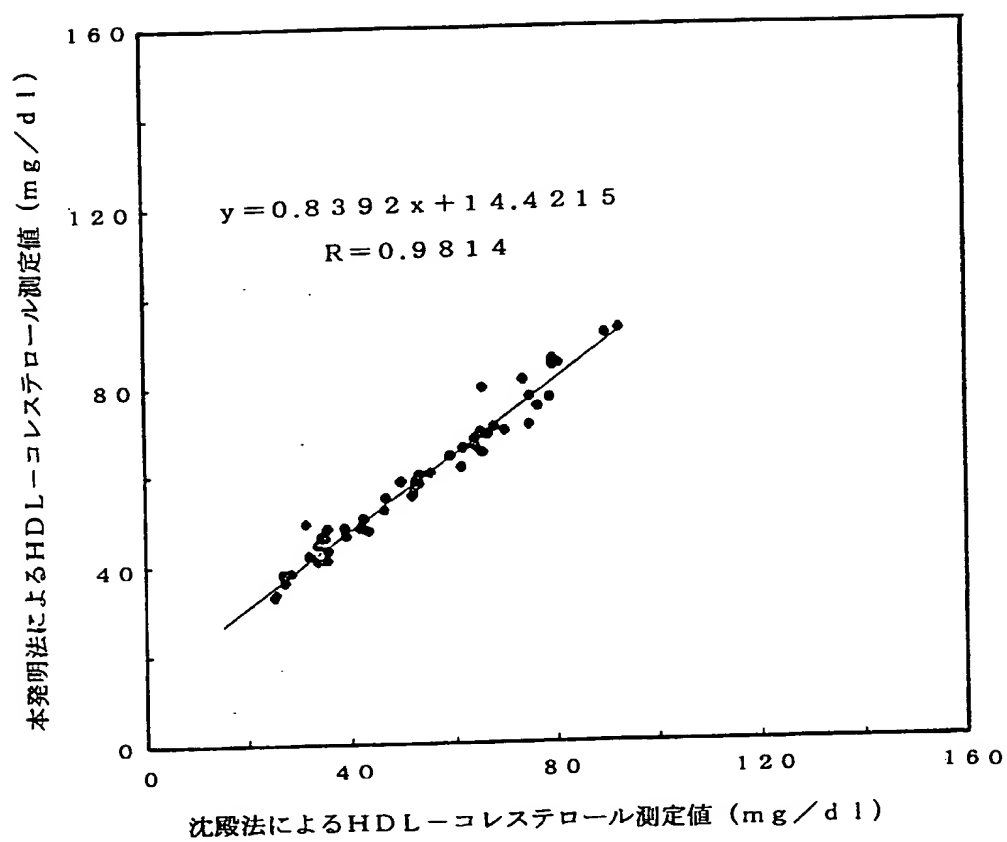
15

20

25

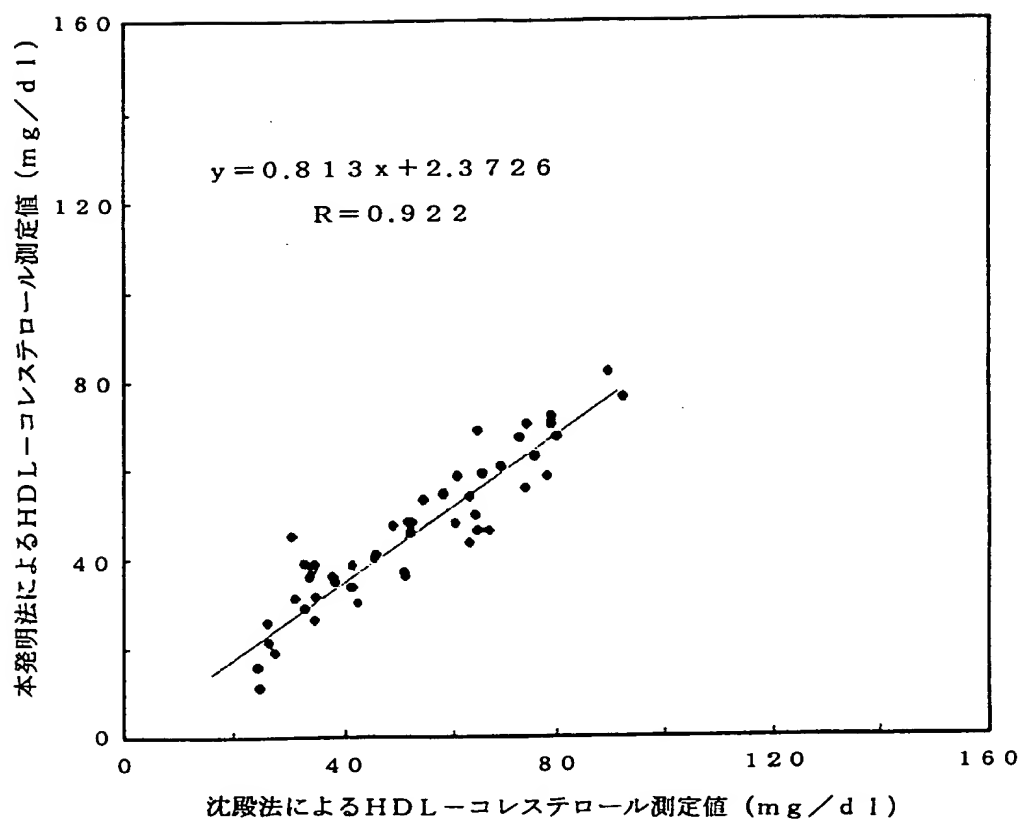
1 / 2

第 1 図



2 / 2

第 2 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/JP98/03771

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁶ C12Q1/60 | | |
|---|---|---|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁶ C12Q1/60 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| P, X | JP, 9-313200, A (Daichi Pure Chemicals Co., Ltd.), 9 December, 1997 (09. 12. 97) & WO, 97/45553, A & AU, 9723075, A | 1-5 |
| A | JP, 9-299, A (International Reagents Corp.), 7 January, 1997 (07. 01. 97) & WO, 97/00971, A | 1-5 |
| A | JP, 7-301636, A (Kyowa Medex Co., Ltd.), 14 November, 1995 (14. 11. 95) & WO, 95/24647, A & EP, 698791, A & US, 5736406, A | 1-5 |
| A | JP, 63-126498, A (Boehringer Mannheim GmbH.), 30 May, 1988 (30. 05. 88) & EP, 265933, A & US, 4892815, A | 1-5 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 30 September, 1998 (30. 09. 98) | | Date of mailing of the international search report 13 October, 1998 (13. 10. 98) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | | Authorized officer |
| Facsimile No. | | Telephone No. |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁸ C12Q1/60

B. 調査を行った分野
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁸ C12Q1/60

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

| C. 関連すると認められる文献 | | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | |
| P, X | JP, 9-313200, A (第一化学薬品株式会社) 09. 12. 1997 (09. 12. 97) & WO, 97/45553, A & AU, 9723075, A | 1-5 |
| A | JP, 9-299, A (国際試薬株式会社) 07. 1. 1997 (07. 01. 97) & WO, 97/00971, A | 1-5 |
| A | JP, 7-301636, A (協和メディックス株式会社) 14. 11. 1995 (14. 11. 95) & WO, 95/24647, A & EP, 698791, A & US, 5736406, A | 1-5 |
| A | JP, 63-126498, A (ヘーリング・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング) 30. 5. 1988 (30. 05. 88) & EP, 265933, A & US, 4892815, A | 1-5 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 30. 09. 98

国際調査報告の発送日

13.10.98

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
平 田 和 男

4 B 7 8 2 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3448